# トリプル四重極 LC/MS による血清中のビタミン D の高速分析

アプリケーションノート


**著者**

M.P. George
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA USA

Andre Szczesniewski
Agilent Technologies, Inc.
Schaumburg, Illinois USA



**概要**

Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution LC (RRLC) システムとマルチモードイオン化 (MMI) を用いた Agilent 6430 トリプル四重極 LC/MS を組み合わせて、血清に含まれる 25-OH $D_2$ および 25-OH $D_3$ の定量のための高速メソッドを開発しました。固相抽出により、マトリックス干渉物とのイオンサプレッションが最小となり、自動化も可能になります。

5〜100 ng/mL の範囲で、良好な直線性 ($R^2 > 0.99$) を得ました。また、日差精度は 10 % を十分下回りました。血清中の検出限界 (LOD) および定量限界 (LOQ) は、それぞれ、2 ng/mL および 3 ng/mL でした。


**はじめに**

ビタミン D は、食物に含まれるカルシウムとリンの腸への吸収を促進する作用とカルシウムの腎臓への再吸収を促進する作用があり、カルシウムとリンの血中濃度を調整します。特に後者の作用は、骨の正常な石化を助けます。また、ビタミン D は、骨の成長や再生にも必要です。最近の研究で、ビタミン D が、がんや心疾患の防止に有効であることが確認され、ビタミン D の血清中濃度のモニタリングに対する関心が新たに高まっています。ビタミン D には、体外および体内のがん細胞を殺す効果があることが示されています。疫学的研究のメタ分析によると、ビタミン D の摂取とがん予防の間には正の相関が見られ、1 日あたり 1,000 IU (25 mg) 摂取した場合、結腸がんのリスクが 50 % 減少し、乳がんおよび卵巣がんのリスクが 30 % 減少することが実証されています (1)。ビタミン D の不足は、高血圧症と関連があり、心疾患のリスクを高めることが知られています。また、最近の研究では、ビタミン D の血清中濃度の減少 (<17.8 ng/mL) が末梢動脈疾患 (PAD) の発生率の増加と関係があることが報告されています (2)。

ビタミン D は、$D_3$ が皮膚で生成され、$D_2$ が植物によって生成されます。栄養補給剤に多く見られるのは $D_2$ です。どちらも肝臓で代謝され、生理活性型である 25-ヒドロキシ誘導体 (25-OH) が生成されます。25-OH $D_2$ と 25-OH $D_3$ はどちらも血中濃度が測定され、合計でビタミン D と総称されます。アッセイにおいて、循環ビタミン D ($D_2$ および $D_3$) の総量を測定できることが極めて重要です。従来、ビタミン D の測定には競合的結合実験および免疫測定法が使用されてきました。ただし、このようなアッセイに使用される抗体の交差反応性は 100 % 未満であり、結果が $D_2$ と $D_3$ の総量を反映していない可能性があります。LC/MS アッセイでは、どちらの種類のビタミン D も正確に定量できることから、最近ではメソッドの選択肢として LC/MS アッセイが受け入れられるようになりました。

Agilent Technologies

本アプリケーションノートでは、ESI-APCI 同時取込みモードでマルチモード (MMI) ソースを使用する Agilent トリプル四重極 LC/MS システムによって血清中のビタミン D の総量を高速、高感度、高精度に決定するメソッドについて説明します。固相抽出サンプル調製メソッドを使用することにより、大量の血清サンプル内の妨害物を検出することなく、マトリックス効果とイオンサプレッションを減らし、その一方で、MMI ソースによって、分析中のサンプルの分解を最小限に抑えることができます。

## 実験

### 試薬類および標準溶液

25-OH $D_2$、25-OH $D_3$ および重水素化 25-OH $D_3$ (Sigma-Aldrich 社および Medical Isotopes 社) の保存液 10 µg/mL をメタノール (Fisher Scientific 社) で希釈し、15 °C 以下で保存しました。これらの保存液を 5 % のウシ血清アルブミンに溶かし、キャリブレーションスタンダード溶液として 5、10、25、50 および 100 ng/mL で準備しました。重水素化 25-OH $D_3$ 内部標準は、脱イオン水で 400 ng/mL に希釈しました。

### 機器

このメソッドは、マルチモードイオン化 (MMI) を使用する Agilent 6430 トリプル四重極 LC/MS と組み合わせた Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution LC (RRLC) システムで開発しました。機器の条件を**表 1** に示します。

### サンプル調製

Biochemical Diagnostics GV-65C 固相抽出カラムを使用して、血清サンプルを以下の手順で処理しました。

1. 2 % のギ酸を溶かした 1 mL のアセトニトリルをテスト対象の各サンプル 250 µL に加え、15 分間放置します。
2. 抽出真空ボックスに固相カラムを立てます。
3. サンプルを 3,000 RPM で 10 分間遠心分離します。

表 1. LC/MS 条件

| | |
|---|---|
| **LC 実行条件** | |
| カラム | ZORBAX Eclipse Plus C-18, 2.1 x 50 mm, 1.8 µm |
| カラム温度 | 50°C |
| 注入量 | 5 µL |
| オートサンプラ温度 | 6°C |
| ニードル洗浄 | フラッシュポート (50:25:25 $H_2O$、IPA:メタノール:$H_2O$、5 秒) |
| 移動相 | A = $H_2O$ + 0.1 % のギ酸<br>B = メタノール + 0.1 % のギ酸 |
| 流量 | 0.5 mL/min |
| アイソクラティック分析 | A = 13 %、B = 87 % |
| 分析時間 | 3.0 min |
| **MS 条件** | |
| イオンモード | ポジティブ、ESI + APCI マルチモードイオン化 |
| 乾燥ガス温度 | 250°C |
| ベーパライザ温度 | 170°C |
| 乾燥ガス流量 | 5 L/min |
| ネブライザ圧力 | 60 psi |
| キャピラリ電圧 | 4000 V |
| コロナ電流 | 2 µA |
| チャージング電圧 | 2,000 V |
| MRM 取り込み | Q1 ピークおよび Q2 ピークの幅 = 0.70 m/z |
| デルタ EM | 200 V |

4. それぞれの抽出カラムを 1 x 1 mL メタノール、1 x 1 mL メタノール:脱イオン水 (50:50) で順に洗浄 (自然落下) します。
5. サンプルの透明層をコンディショニング済みのカラムに移します。
6. そのカラムを 1 x 1 mL メタノール:水 (50:50)、次に 1 x 1 mL メタノール:水 (75:25) で順に洗浄（自然落下）します。
7. 30 秒間減圧し、次に各カラムに 200 µL の n-ヘプタン (Scientific Products 社) を加えます。n-ヘプタンを 2 分間放置した後、5〜7 分間十分に減圧します。
8. 250 µL のメタノールを使用し、自由落下で 2 分間のみ溶出させた後、250 µL の脱イオン水で溶出させます。

### 分析パラメータ

ビタミン $D_2$、$D_3$ および重水素化内部標準 (IS) の分析に使用したパラメータを**表 2** にまとめます。

表 2. 分析パラメータ

| 化合物名 | RT (分) | MRM トランジション | フラグメンター電圧 | ドウェル (msec) | コリジョンエネルギー (EV) |
|---|---|---|---|---|---|
| 25- ヒドロキシビタミン $D_3$ | 0.99 | 401.3 > 383.3 | 100 | 150 | 3 |
| 25- ヒドロキシビタミン $D_2$ | 1.12 | 413.3 > 395.3 | 100 | 150 | 3 |
| IS-25- ヒドロキシビタミン $D_3$-d6 | 0.98 | 407.3 > 389.3 | 100 | 150 | 3 |

## 結果と考察

### 固相抽出

血漿および血清サンプルに含まれるビタミン D の分析では、複数のサンプル調製メソッドを利用できます。ただし、液液抽出メソッドでは、乾燥手順とそれに続き LC 移動相と相溶性のある溶媒中への再溶解が必要です。多段階のオフライン固相抽出メソッドを用いることにより、迅速化とハイスループットが実現できます。この実験で使用したメソッドは、マトリックス効果とイオンサプレションを減らすことができ、ビタミン $D_2$ と $D_3$ のみが主要な成分となるきれいなクロマトグラムを得ることができます (**図 1**)。

### 高精度で再現性の良い定量

5、10、25、50 および 100 ng/mL の濃度を用いて、25-OH ビタミン $D_2$ および 25-OH $D_3$ の検量線を作成しました。**図 2** は、2 種類のビタミン D について優れた直線性が見られ、1.000 に極めて近い $R^2$ 値が得られたことを示しています。各較正用標準溶液の定量に関する (アッセイ間の) 日差変動率 (CV) も優れていて、1.7 % にまで減少する場合もあり、10 % を超えることはありませんでした (**表 3**)。

### 実際のサンプルでの高感度

別の LC/MS 手順を使用して事前に定量した 66 の新鮮な血清サンプルセットを使用して、このメソッドを検証しました。以前のメソッドを使用した定量の相関係数は非常に良く、R の値は 0.979 でした。どちらのビタミン D についても、LOD および LOQ は、それぞれ 2 ng/mL および 3 ng/mL であり、どのサンプルでも干渉物は一切観察されませんでした。本アプリケーションノートで説明するメソッドは、ビタミン D の試験に関する診断向けソリューションではない点に注意が必要です。ビタミン D の検出および定量の性能を示すために、このメソッドの検証には新鮮な血清サンプルを使用しました。

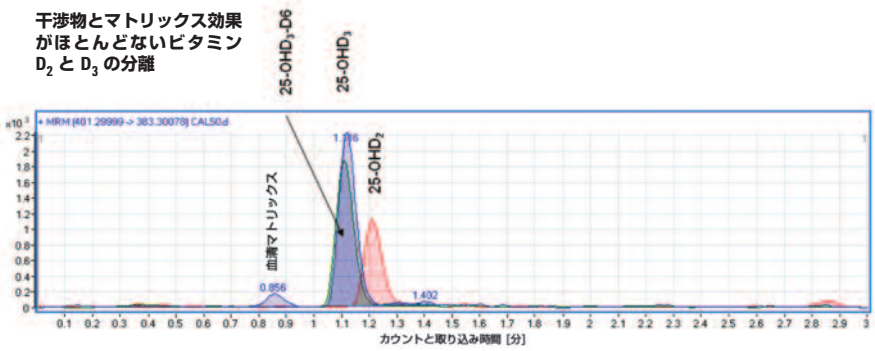
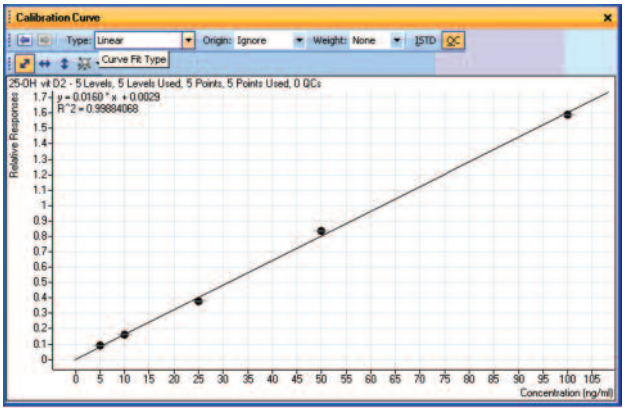



図 1. ビタミン $D_2$、$D_3$ および内部標準を含む代表的な血清サンプルのトータルイオンカレントクロマトグラム

**5～100 ng/mL の $D_2$ および $D_3$ の正確な定量**

**A**




**B**

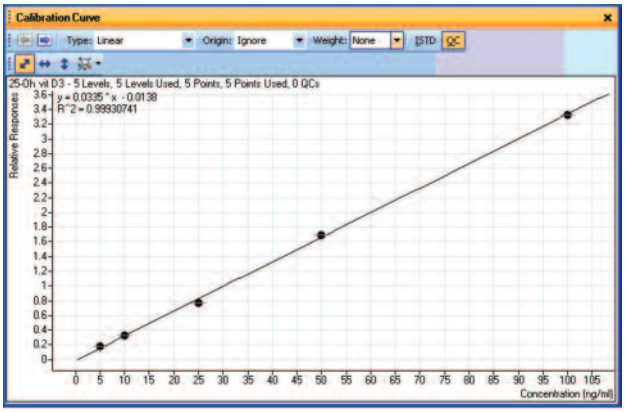



図 2. 5 % のウシ血清アルブミン中の 25-OH $D_2$ (A) および 25-OH-$D_3$ (B) の検量線

図 3. アッセイ間の定量精度 (変動率)

| 濃度 (ng/mL) | 25-OH $D_2$ (%) | 25-OH $D_3$ (%) |
|---|---|---|
| 5 | 7.03 | 6.74 |
| 10 | 5.73 | 3.18 |
| 25 | 4.46 | 3.53 |
| 50 | 3.81 | 3.34 |
| 100 | 2.04 | 1.70 |

## 結論

トリプル四重極 LC/MS を使用して、本法が血清に含まれる 25-OH ビタミン $D_2$ および $D_3$ の高精度、高感度で、再現性の良い検出を実現するメソッドであることを示しました。LODは 2 ng/mL と 3 ng/mL でした。固相抽出サンプル調製により、血清に含まれる脂質およびその他の化合物が原因で起こるマトリックス効果とイオンサプレションを最小限に抑えることができます。 ESI-APCI 同時取込みモードで　マルチモードソースを使用すると、サンプルの劣化 (25-OH 基の脱離) が最小になります。分析は 5 分未満で実行でき、標準的な固相サンプル調製自動化システムを使用して自動化することも可能です。

## 謝辞

SPE カラムを提供いただいた Biochemical Diagnostics 社 (ニューヨーク州エッジウッド) とこのメソッドの検証に使用した 66 のサンプルを提供していただいた Mayo Clinic (ミネソタ州ロチェスター) の Frank Crow、David Barnidge、Ravinder Singh、James Bruton に謝意を表します。

## 参考文献

1. E. D. Gorham, Garland F. C., C. F. Garland, W. B. Grant, S. B. Mohr, M. Lipkin, H. L. Newmark, E. Giovannucci, M. Wei, M. F.Holick. "Optimal vitamin D status for colorectal cancer prevention: a quantitative meta analysis", Am J Prev Med. **32**, 210-216 (2007).

2. M. L. Melamed, P. Muntner, E. D. Michos, J. Uribarri, C. Weber, J. Sharma, P. Raggi. "Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and the Prevalence of Peripheral Arterial Disease. Results from NHANES 2001 to 2004". Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **28**, 1179-1185 (2008).

www.agilent.com/chem/jp

本文書記載の製品は薬事法に基づく医療機器の登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジーは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published in Japan September 14, 2009
5990-4549JAJP

Agilent Technologies